

各種眼疾患における眼内免疫抑制酸性蛋白

著者	竹田 洋介
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54626

博士論文

各種眼疾患における眼内免疫抑制酸性蛋白

東北大学医学部附属病院眼科

竹田 洋介

①

博士論文

各種眼疾患における眼内免疫抑制酸性蛋白

東北大学医学部附属病院眼科

竹田 洋介

要約

血清免疫抑制酸性蛋白 (IAP) は腫瘍や炎症のマーカーとして、臨床的に有用とされている。我々は先に IAP が活動期ベーチェット病および眼外に播種がみられる網膜芽細胞腫で高値を示すことを報告した。今回、硝子体手術に際して得られたぶどう膜炎 4 例 (真菌症 2 例, ベーチェット病 1 例, 桐沢型ぶどう膜炎 1 例), 眼内腫瘍 4 例 (脈絡膜悪性黒色腫 1 例, 網膜芽細胞腫 3 例), 黄班前線維症 4 例, 増殖糖尿病網膜症 (PDR) 4 例の硝子体, 白内障手術時に得られたぶどう膜炎 4 例 (原田氏病 1 例, ベーチェット病 2 例, サルコイドーシス 1 例), 老人性白内障 5 例, 網膜色素変性症に併発した白内障 1 例の前房水について IAP 値を一元放射免疫拡散法により測定した。その結果 IAP は硝子体あるいは前房水においてぶどう膜炎や腫瘍で増加することが明らかとなった。またアルブミン当りの IAP 量 (IAP%) の測定でぶどう膜炎群に有意に高く, 特にベーチェット病の症例では, 炎症の活動期にあるか寛解期にあるかで, 血清 IAP 値では差がないのに対し, 前房水 IAP 値では活動期にあった症例でひじょうに高い値を示した。そして抗 IAP 抗体によりベーチェット病眼に免疫染色を行った結果, 眼内に浸潤した細胞に IAP 陽性細胞が多数みられ, この IAP 値の上昇と関連があり, 眼局所の IAP は眼内でも分泌産生され, 血清値とは独立した動きをしている可能性が示唆された。またベーチェット病患者に対しシクロスポリン A 投与の前後で血清 IAP 値を測定した結果, 血清 IAP 値は治療に応答して変動し, 治療の効果判定にも有用であることが明らかとなった。

I 緒言

免疫抑制酸性蛋白 (Immunosuppressive Acidic Protein : IAP) は、石田ら¹⁾、田村ら²⁾ によって癌患者腹水、血清より分離された α -1-酸性糖蛋白の一分画であり、腫瘍マーカーのひとつとして臨床的に利用されている³⁾。また血清 IAP は生理的に体内において副腎皮質ステロイドホルモンと鏡像を示すような日内変動を示すことが明らかにされている⁴⁾。さらに各種疾患との関係では悪性腫瘍のみならず自己免疫性疾患や炎症性疾患においても高値を示し^{1) 2)}、各種癌治療の効果判定、術後経過の観察に有用とされており、眼科領域においてもベーチェット病で特にその活動期に一致して血清 IAP 値が高値を示すことが報告され^{5) 6)}、また眼外に播種がみられる網膜芽細胞腫で上昇することが示されている⁷⁾。

今回我々は、種々の眼疾患の硝子体および白内障手術時に得られた硝子体、前房水中に含まれる IAP 値を測定した。その結果、硝子体あるいは前房水の IAP は眼内炎症や腫瘍で増加することが明らかとなった。さらに抗 IAP 抗体によりベーチェット病眼に免疫染色を行い、眼内における IAP 産生の可能性について検討した。また臨床的にも、ベーチェット病に対するシクロスポリン A 療法の際の血清 IAP 値の変動について検討した。

II 実験方法

硝子体および前房水における IAP 量の測定

対象は東北大学附属病院眼科で手術された症例のうち、硝子体手術を必要とし、硝子体の採取が可能であったぶどう膜炎 4 例（真菌症 2 例、ベーチェット病 1 例、桐沢型ぶどう膜炎 1 例）、眼内腫瘍 4 例（脈絡膜悪性黒色腫 1 例、網膜芽細胞腫 3 例）、黄斑前線維症 8 例、増殖糖尿病網膜症（PDR）4 例についてである。

前房水はぶどう膜炎 4 例（原田氏病 1 例、ベーチェット病 2 例、サルコイドーシス 1 例）、老人性白内障 5 例、網膜色素変性症に併発した白内障 1 例で白内障手術時に採取した。ぶどう膜炎の症例では血清も採取し、血清 IAP 値およびアルブミン量を測定した。ぶどう膜炎の症例は、硝子体を採取した症例 1、2 は経過中に硝子体混濁が出現、増強したために硝子体手術を行った。症例 3 は桐沢型ぶどう膜炎を疑い硝子体手術を行ったが、術後に前房蓄膿を生じてベーチェット病と診断された。症例 4 は桐沢型ぶどう膜炎で硝子体手術を行い、硝子体中にヘルペス群ウイルス抗体価の上昇を認めた。前房水を採取した症例 1、3、4 は比較的炎症が落ち着いており、視力も低下したことから白内障手術を行った。症例 2 は眼内の炎症に引き続いて続発性緑内障を起こしたため、炎症の残っている時期ではあったが、白内障手術を施行した。

硝子体採取の方法を略述すると、硝子体手術の際に灌流口、硝子体切除器、光ファイバーの三者を眼球に装着後、灌流液による灌流を始める前に、硝子体収集用ボトルを硝子体切除器の吸引チューブの途中に取り付け、空気灌流下に硝子体を採取した⁸⁾。この方法で硝子体は灌流液により薄まることなく安全に採取する

ことができた。また眼内腫瘍の症例については、眼球摘出後に半割し硝子体を吸引した。

前房水の採取は前房内操作を行う前に角膜輪部より27G針にて直接吸引した。眼圧はその後粘弾性物質を注入して調節した。

硝子体および前房水採取については術前に患者に説明し、同意を得た。

IAP量は一元放射免疫拡散 (SRID) 法にて測定した。血清の測定には市販の IAP プレートを用いた。硝子体または前房水 IAP 値の測定には low level IAP プレートを用いた。low level IAP プレートは抗ヒト IAP ヤギ血清 (抗体価 1:320) を含む寒天平板で一枚のプレートに直径 4mm の試料注入穴を 10 穴あけてあり、この穴に試料を 15 μ l ずつ注入し 36 $^{\circ}$ C 48 時間反応させ、沈降輪を形成させた。沈降輪の直径を測定し基準液 (IAP 濃度 5, 10, 20, 40 μ g/ml) の測定値から検量線をひき、試料 1ml 当りの IAP 値を求めた。市販 IAP プレート、low level IAP プレートの測定範囲は、それぞれ 30~1500 μ g/ml¹⁾、3~100 μ g/ml である。硝子体または前房水については BCG 法によりアルブミン量を測定し、アルブミン量当りの IAP 値 (IAP%: (硝子体または前房水 IAP 値 / 硝子体または前房水アルブミン量) X100) を求めた。また血清 IAP 値およびアルブミン量を測定した症例では IAP Index (硝子体または前房水 IAP% / 血清 IAP%) を求めた。測定限界以下の場合は 3 μ g/ml とし統計的に処理したが、IAP% については除外して処理した。

統計学的有意差の検定は、Mann - Whitney's U - test に

より行なった。

免疫組織化学

ベーチェット病眼球標本は有痛性眼球癆のために当科で眼球摘出を受けた症例から得られた，ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。

免疫染色は酵素抗体間接法を採用した。3 μ m切片を作成，スライド上に伸展しキシロールで脱パラフィンした後，5%非感作ブタ血清で20分間反応させ非特異反応を除去し，1/800に希釈した一次抗体（抗ヒト IAPヤギ血清）を4℃で12時間反応させた。次に，0.3% hydrogen peroxide-methanol 溶液に室温で30分間浸し，内在性ペルオキシダーゼを阻止した。その後，1/400に希釈した二次抗体（ペルオキシダーゼ標識抗ヤギブタ血清）と4℃で12時間反応させた。コントロールの切片では一次抗体を除いた。全ての抗体は，1% bovine serum albumin (BSA)，0.05% Tween 20 を含む phosphate buffered saline (PBS) 溶液（TW-BP）で希釈した。それぞれの反応の間に，切片を0.05% Tween 20 を含む PBS (TPBS) で3回洗浄した。発色は切片を 0.02% 3,3'-diamino benzidine-HCl, 0.005% hydrogen peroxide を含む 50mM Tris HCl, pH 7.6 溶液に室温で2分間浸して行った。methyl green 染色液で核染色を行い，エタノールで脱水，キシロールで透徹後，封入して光顕にて観察した。

ベーチェット病患者の血清 IAP 値測定

東北大学眼科ぶどう膜炎外来通院中の難治性ベーチェット病患者 4 名に対してシクロスポリン A ($3\text{mg} / \text{kg} / \text{day}$) 投与を行い、発作の前後、および発作後シクロスポリン A 投与開始の前後の血清 IAP 値を測定した。

統計学的有意差の検定は、Mann - Whitney's U - test により行なった。

III 結果

硝子体および前房水 IAP 値

各疾患群における IAP 値に差がみられた。硝子体については、IAP 値でぶどう膜炎群、腫瘍群、糖尿病性網膜症群が黄斑前線維症群に対して高値を示した ($p < 0.05$) (表 1, 図 1)。しかし IAP% ではぶどう膜炎群が腫瘍群、糖尿病性網膜症群に対して有意に高かった ($p < 0.05$) (表 1, 図 2)。

前房水における測定ではぶどう膜炎群と白内障および網膜剥離群との間に IAP 値に有意差が認められた ($p < 0.05$) (表 2, 図 3)。IAP% では老人性白内障群で IAP 値が $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の症例が多く、検討できなかった。

ぶどう膜炎群の中では、血清値でも $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ を越える高い値を示したものが多かったが、特に前房水の測定においてベーチェット病 2 例で、炎症の活動期にあるか寛解期にあるかで、血清 IAP 値では差がないのに対し、前房水 IAP 値では活動期にあった症例でひじょうに高い値を示し、Index でも 3.0 を越える高

値であった。(表3)

免疫組織化学

ベーチェット病眼では、毛様体などのぶどう膜や網膜の著明な変性によりそれらの構造はほとんど破壊されており、眼球内は増殖した肉芽組織で充満していた(図4a)。増殖膜内には新生血管が認められ、その周囲に浸潤細胞が多数存在していた。それらの浸潤細胞の中に IAP陽性細胞が認められた(図4b)。また血管内皮細胞にも陽性所見が認められた。

ベーチェット病患者の血清 IAP 値測定

シクロスポリンA投与をうけなかった症例では血清 IAP 値は発作後も 500 $\mu\text{g/ml}$ 前後の高値を持続していた(図5a)。一方、シクロスポリンA投与をうけた症例では投与後の血清 IAP 値は著明に減少し ($p<0.05$)、臨床症状の経過とよく一致していた(図5b)。

IV 考按

今回我々は硝子体および前房水 IAPの測定に市販されているものを微量測定用に改良した low level IAP プレートによる SRID法を用いた。この方法は手技が簡便であり、また測定に必要な検体量も15 μl とごく少量ですむことから、わずかしかな検体を得られない眼内液の測定の場合に適していると思われる。但し、測定範囲が 3~100 $\mu\text{g/ml}$ であり、検体中の IAP濃度がそれ以

下でもあるいは大きくこえた場合でも沈降輪は形成されない。

IAPは分子量50000, 等電点3.0, 糖含量31.5%の α -1-酸性糖蛋白の一分画であり, in vitro ではリンパ球幼若化反応, リンパ球の混合培養反応の抑制, インターフェロンによるナチュラルキラー細胞の活性化の抑制, in vivo では, 液性抗体産生の抑制, 遅延型アレルギー反応の抑制, 腫瘍増殖促進作用, サプレッサーマクロファージの誘導といった生物学的作用が知られており, 産生細胞はマクロファージ, 多核白血球, 肝細胞とされている³⁾。

局所における IAPの測定およびその意義については, Sekiらが脳脊髄液について報告している⁹⁾。彼らによると正常者の脳脊髄液における IAP値, IAP%: (脳脊髄液IAP値/脳脊髄液アルブミン量) X100の平均値はそれぞれ 1.66 μ g/ml, 0.64であったという。またいくつかの神経疾患についても測定し, 活動期の神経ベーチェット, 活動期および寛解期の多発性硬化症で脳脊髄液中のIAP値, IAP%とも上昇し, その平均値は IAP値についてそれぞれ6.59, 3.91, 3.50 μ g/ml, IAP%について1.50, 1.65, 1.23であったと報告し, 多発性硬化症では寛解期から活動期に向かったの脳脊髄液 IAP値の上昇は, 血清IAP値および脳脊髄液蛋白量の上昇に比して大きく, 血液からの浸出だけでなく血液脳関門内での IAP産生の可能性を述べている。神経ベーチェット病でも, 寛解期に脳脊髄液 IAP値が著明に低下しても血清 IAP値は比較的高い値を示し, 中枢神経内ではIAPは独立した動きをすることが報告されている¹⁰⁾。

硝子体については, IAP値でぶどう膜炎群, 腫瘍群, 糖尿

病性網膜症群が黄斑前線維症群に対して高値を示した($p<0.05$). しかし IAP%ではぶどう膜炎群が腫瘍群, 糖尿病性網膜症群に対して有意に高かった($p<0.05$). 硝子体における IAPを含めた蛋白の増加の要因として出血, 網膜下液の混入, 血液網膜柵の破綻, 眼内での産生などが考えられる. 眼内産生を見る場合, 血清中から血液網膜柵を通過してくるものの指標として, 分子量が小さく, 眼内で産生されないアルブミンを用いた方が, 偽陰性が少ないといわれている^{11, 12}). いずれの疾患でも血液網膜柵の破綻が想定されるが IAP値で高値を示した腫瘍群とぶどう膜炎群との間で IAP%に有意差がみられたことは後者の IAPの上昇に別の機序が考えられ, 眼内で産生されている可能性が考えられる. IAPは好中球およびマクロファージで産生されることが知られている. また網膜や毛様体に炎症が存在すると, 硝子体ではヒアルロン酸網の崩壊や, 顆粒状物質の沈着, マクロファージの浸潤などが観察される. 特に桐沢型ぶどう膜炎の硝子体でも認められる細胞は主としてマクロファージであることが報告されている¹³). またベーチェット病においては初期病変に共通した組織学的所見として, 血管炎とその周囲の好中球, リンパ球, マクロファージの浸潤があげられている¹⁴). これらのことから桐沢型ぶどう膜炎において IAPは眼内で主にマクロファージにより局所的にも産生され, 一連の炎症に関与し, またベーチェット病においては好中球により眼内で産生されている可能性が示唆される.

前房水については硝子体と同様にぶどう膜炎群で IAP値, IAP%とも高値を示した. 老人性白内障を正常者として考えると,

全例3 μ g/mlであり、正常では血液房水柵からの漏出は無く、房水内にはほとんど存在しないと思われる。

ぶどう膜炎のなかでは、活動期であったベーチェット病の一例が前房水 IAP値、IAP%、Indexでひじょうに高い値を示した。ベーチェット病では前述した血管炎に加え、臨床的にも前房蓄膿性虹彩毛様体炎では前房内に著明な好中球の遊出が見られる。これらの好中球が IAPの上昇および眼内の炎症に関与しているのではないかと考えられる。血清値は他のぶどう膜炎と変りなく、眼内での IAP産生が示唆され、また眼内では血清値とは独立した動きをするのではないかと考えられる。

免疫組織化学ではベーチェット病の症例で、眼内に IAP陽性細胞が認められた。Aozasaらは結核など反応性増殖によるもの、あるいは悪性疾患により増殖したマクロファージが抗 IAP血清により染色されることを示し、そのマクロファージにより IAPが産生、分泌されているだろうと述べている¹⁵⁾。本病においても眼内に浸潤した IAP陽性細胞により局所的に IAPが分泌されている可能性が示唆される。

また血清 IAP値でもベーチェット病においてはその活動期に高値を示し、本病の診断における IAPの有用性が知られている^{5) 6)}。最近本病の治療に免疫抑制剤であるシクロスポリンAが投与されているが、その投与による眼症状の改善とともに血清 IAP値は低下し、シクロスポリンAの効果判定にも有用であった¹⁷⁾。血清 IAP値は本病の病勢を現す指標として、ひじょうに有用であると思われた。

V 結論

以上より炎症性眼疾患とくにベーチェット病において硝子体および前房水で IAP 値が高いことが判明した。そして眼内に浸潤した細胞に IAP 陽性細胞が多数みられ、この IAP 値の上昇と関連があり、眼局所の IAP は眼内でも産生され、血清値とは独立した動きをしている可能性が示唆された。また血清 IAP 値がベーチェット病のシクロスポリン A による治療効果判定に有用であることが示された。

文献

- 1) 石田名香雄, 田村啓二, 柴田芳美: 免疫抑制酸性蛋白の性状と癌患者における測定意義. 医学のあゆみ 115: 423-432, 1980.
- 2) 田村啓二, 柴田芳美, 石田名香雄: 免疫抑制酸性蛋白. 第5回阿蘇シンポジウム, 癌と免疫. 東京, 57-71, 南山堂, 1982.
- 3) 田村啓二: IAPの測定とその臨床的意義. 血清反応のあゆみ. 東京都臨床衛生検査技会—血清検査研修会記録8: 194-218, 1986.
- 4) Tamai M, Yamaguchi K: Diurnal variation of Immunosuppressive acidic protein. Jpn J ophthalmol 34: 196-199, 1990.
- 5) 山口克宏, 横山尚彦, 菅野陳一郎, 他: ぶどう膜炎患者の血清免疫抑制酸性蛋白. 眼紀 38: 1829-1832, 1987.
- 6) Yamaguchi K, Yokoyama T, Kanno C, et al: Immunosuppressive Acidic protein in Behcet's Disease. Am J Ophthalmol 105: 213-214, 1989.
- 7) 高橋玲子, 山口克宏, 玉井信: 網膜芽細胞腫におけるIAP (免疫抑制酸性蛋白) の測定. 日眼会誌 94: 593-596, 1990.
- 8) Tamai M, Nakazawa M: Collecting system to obtain vitreous humor in clinical cases. Arch Ophthalmol 109: 465-466, 1991.

- 9) Seki H, Tsukamoto T, Aso H, et al: Intrathecal synthesis of Immunosuppressive acidic protein(IAP) in patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. J Neurol Sci 85: 259-266, 1988.
- 10) Tsukamoto T, Seki H, Takase S, et al: Significant increase in immunosuppressive acidic protein(IAP) in serum of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. J Neurol Sci 75: 353-361, 1986.
- 11) Danser AHJ, Deinum J, Derkx FHM, et al: Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. J Clin Endocrinol Metab 68 : 160-167, 1989.
- 12) van der Voet JCM, Liem A, Otto AJ, et al: Intraocular antibody synthesis during experimental uveitis. Invest Ophthalmol 30: 316-322, 1988.
- 13) 臼井正彦, 長谷見通子, 大西由子, 他: ぶどう膜炎における硝子体の電顕的観察と免疫生化学的分析. 臨眼 38 : 381-387, 1984.
- 14) 猪股 孟, 鬼木信乃夫, 生井 浩: ベーチェット病眼病変の病理組織学-23症例についての検討-. 谷口慶晃, 猪股孟変: 眼科 Mook 28: 眼病理学, 232-243, 金原出版,

東京, 1986.

- 15) Aozasa K, Ueda T, Ayata T, et al: Immunohistochemical determination of immunosuppressive acidic protein in reactive and neoplastic disease of macrophage. *Cancer* 60:2424-2427, 1987.
- 16) 山口克宏, 武藤 勉, 竹田洋介, 玉井 信: シクロスポリンA投与によるベーチェット病患者の血清免疫抑制酸性蛋白の変化. 第20回日本ぶどう膜炎・眼免疫研究会抄録, 240, 1991.

表 1

各疾患群における硝子体 IAP値, アルブミン量, IAP% (平均値±標準偏差)

	症例数	IAP値 μg/ml	アルブミン量 mg/ml	IAP%
A ぶどう膜炎	4	56.00 *	3.20	2.00
		±19.17	±1.93	±1.01
B 腫瘍	4	46.75 *	5.53	0.82 **
		±29.52	±3.16	±0.11
C 黄斑前線維症	8	5.75	0.49	1.09 **
		±4.13	±0.34	±0.37
D 糖尿病性網膜症	4	33.50 *	4.68	0.75 **
		±14.91	±0.96	±0.42

* 黄斑前線維症と有意差を認めるもの (P<0.05 : Mann-Whitney's U-test)

** ぶどう膜炎と有意差を認めるもの (P<0.05 : Mann-Whitney's U-test)

表 2

各疾患群における前房水 IAP値、 アルブミン量、 IAP% (平均値±標準偏差)

	症例数	IAP値 $\mu\text{g/ml}$	アルブミン量 mg/ml	IAP%
A ぶどう膜炎	4	32.25 * ± 44.51	1.03 ± 0.95	2.23 ± 1.40
B 老人性白内障	5	3.00 ± 0	0.14 ± 0.05	- -
C 網膜色素変性症	1	9.00	0.60	1.50

* 老人性白内障と有意差を認めるもの ($P < 0.05$: Mann-Whitney's U-test)

図 1

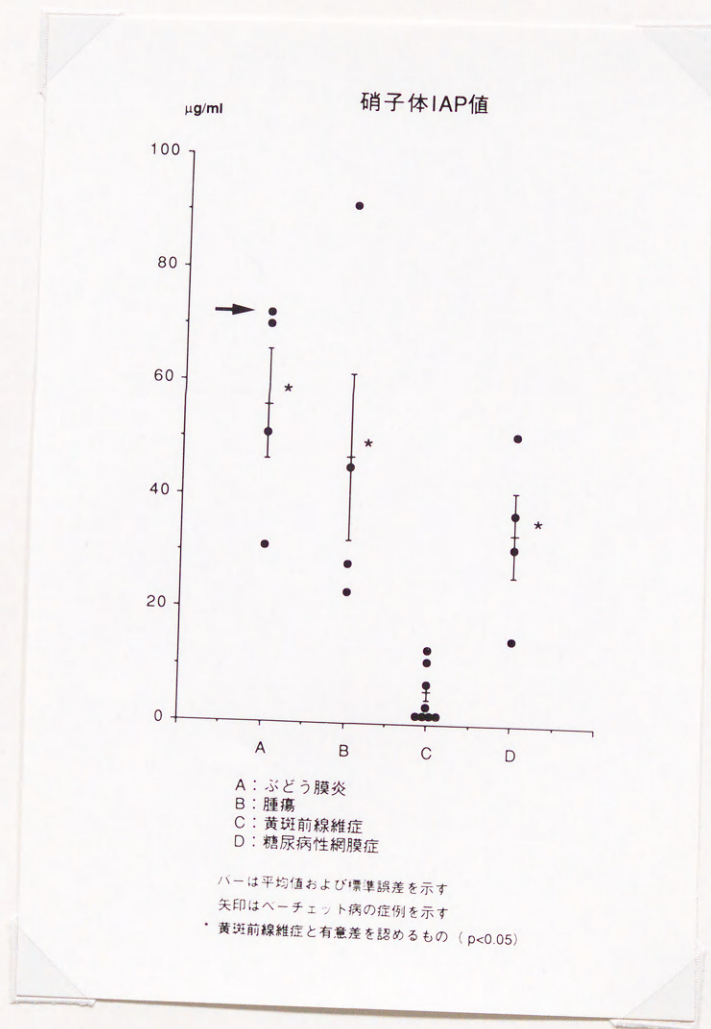


図 2

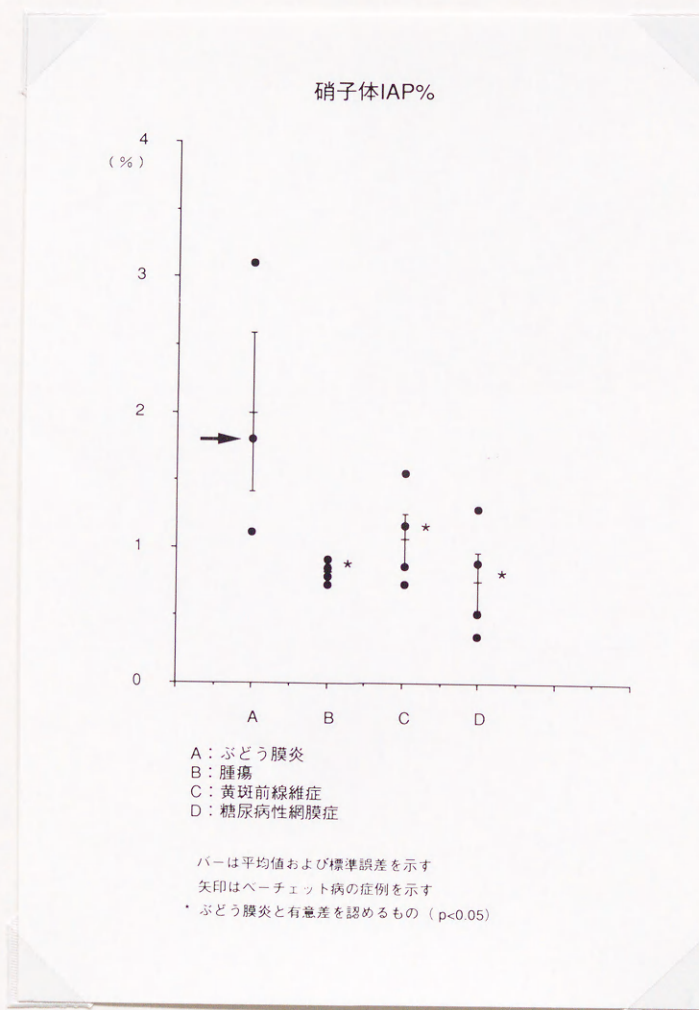


図 3

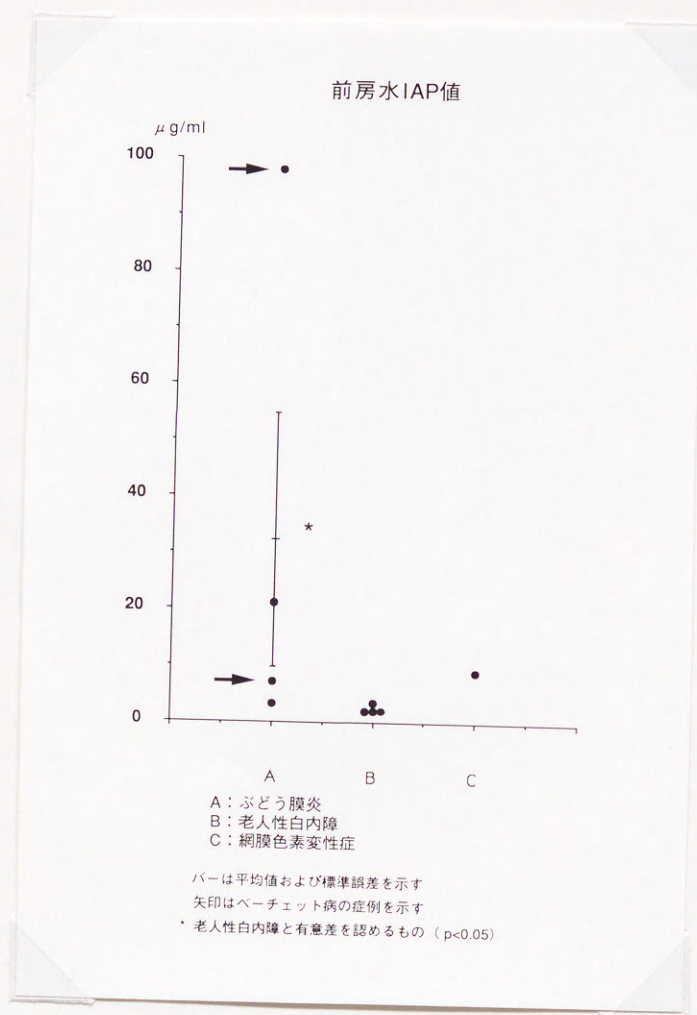


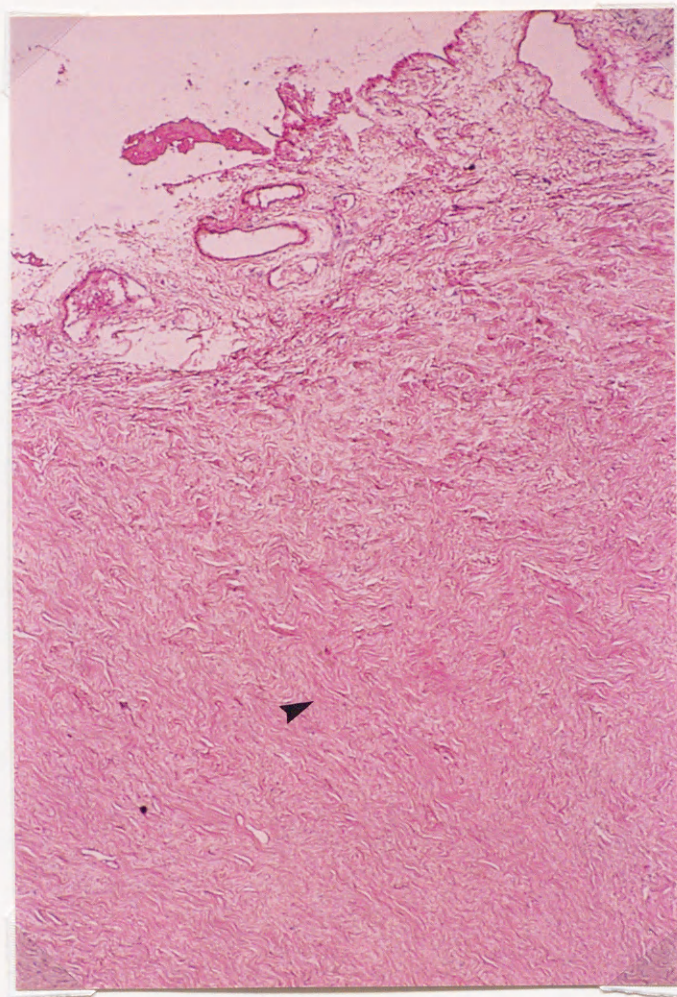
表 3

ぶどう膜炎各症例における硝子体、前房水、および血清の
IAP値、アルブミン量、IAP%、Index

硝子体							
症例	硝子体			血清			Index
	IAP値 μg/ml	アルブミン mg/ml	IAP%	IAP値 μg/ml	アルブミン mg/ml	IAP%	
1 真菌症	70	-	-	-	-	-	-
2 真菌症	31	1	3.10	1064	37	2.88	1.08
3 ベーチェット病	72	4	1.80	600	50	1.20	1.50
4 網膜型ぶどう膜炎	51	4.6	1.11	420	43	0.98	1.14

前房水							
症例	前房水			血清			Index
	IAP値 μg/ml	アルブミン mg/ml	IAP%	IAP値 μg/ml	アルブミン mg/ml	IAP%	
1 原田氏病	21	0.9	2.33	553	41	1.35	1.73
2 ベーチェット病	7	0.4	1.75	542	42	1.29	1.36
3 ベーチェット病	98	2.4	4.08	514	38	1.35	3.02
4 サルコイドーシス	3	0.4	0.75	373	42	0.89	0.84

図 4 a

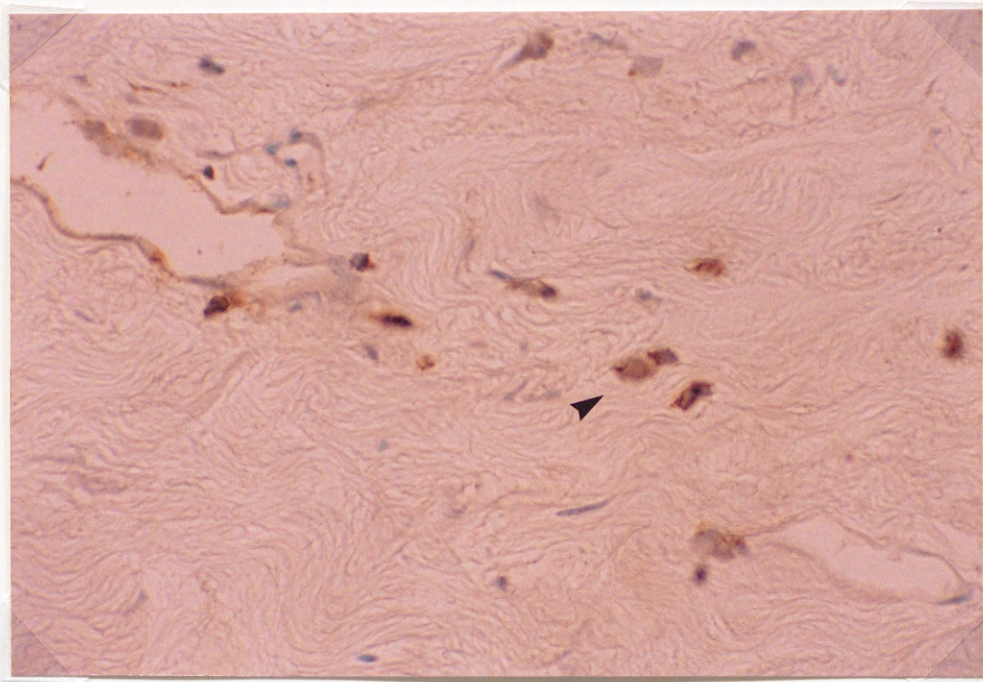


500 μ m

ベーチェット病眼

眼球内は増殖した肉芽組織で充満しており（矢印），網膜，ぶどう膜の構造は消失している．

図 4b



50 μ m

図4bベーチェット病眼

増殖膜内の新生血管周囲に浸潤している細胞にIAPに対する陽性反応が認められる
(矢印)。

図 5a

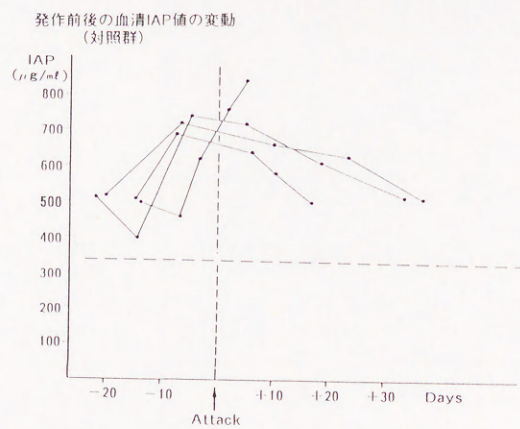
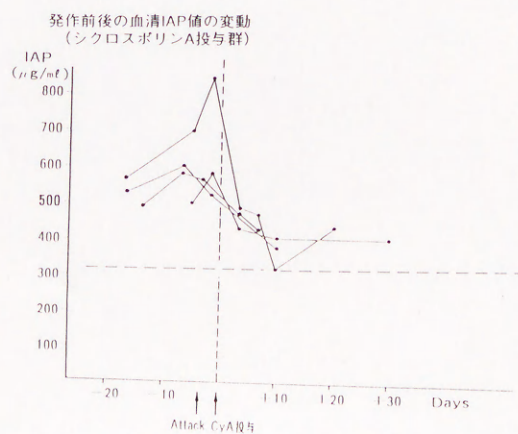
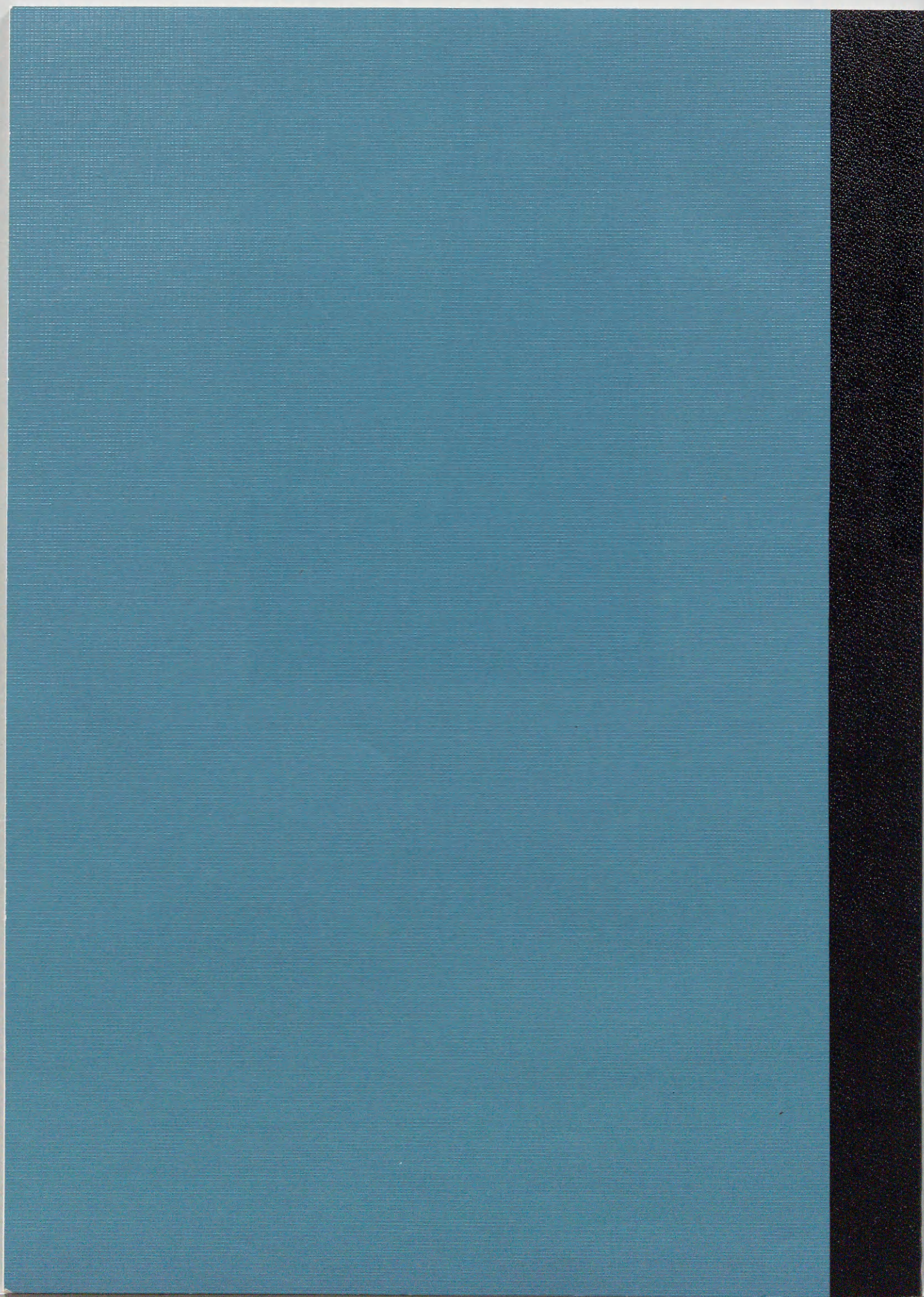


図 5b



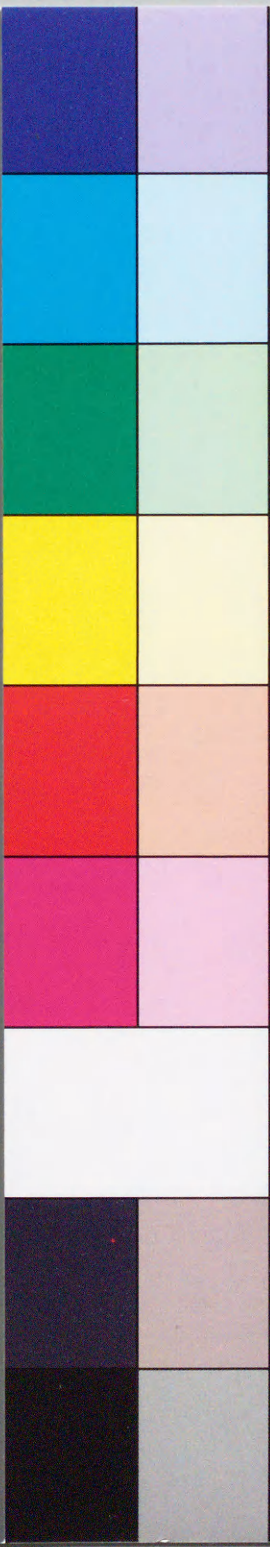


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

